

Three-dimensional mass spectrometry imaging of biomedical tissues

Citation for published version (APA):

Vos, D. R. N. (2021). *Three-dimensional mass spectrometry imaging of biomedical tissues*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20210409nv>

Document status and date:

Published: 01/01/2021

DOI:

[10.26481/dis.20210409nv](https://doi.org/10.26481/dis.20210409nv)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Mass spectrometry imaging (MSI) has become an established tool to spatially resolve the molecular make-up of biomedical tissues. Advancements in sample preparation and instrumentation facilitated the development of 3D-MSI to gain a deeper understanding of the spatially and molecular complexity of biological processes in tissues. In this thesis, the challenges in applying 3D-MSI in biomedical research are appraised and addressed. The newly developed methods and insights are subsequently applied to multi-patient cohort studies.

In **chapter 1** the readers are introduced to the field of 3D-MSI and its current challenges. These challenges are focused on two major fields: sample preparation and data analysis. For both, aspects are discussed that have to be considered when performing 3D-MSI experiments as well as the obstacles that still need to be resolved. One of these aspects is how to prepare single-cells for 3D-SIMS or serial sections for 3D-DESI and 3D-MALDI MSI to enable 3D reconstruction. The experimental design is also discussed and how to ensure reproducibility, which follows into outlier detection as one of the challenges to be addressed during data analysis. In addition, 3D image reconstruction and multimodal 3D-imaging are reviewed. Overall, this chapter provides considerations that aid in setting-up optimal (multi-patient) 3D-MSI studies.

Chapter 2 focuses on the sample preparation of FFPE samples and whether lipids can be a possible new mine to dig for 3D-MSI of these biomedical tissues. An in-depth analysis of the lipid classes detectable from fresh frozen and formalin-fixed mouse and rat kidney tissues gave noticeable differences. Amine-containing lipids are completely depleted upon fixation which is most likely a result of cross-linking of these lipids with each other and with amine-containing proteins. As a result of this depletion, an increase in sulfatides and cholesterol is observed. These class-specific lipid changes upon formalin fixation show that care has to be taken when biological statements are made based on lipid data from FFPE tissues.

In **chapter 3** some of the challenges in the analysis of 3D-MSI data are being tackled by setting up a pipeline for handling multi-patient 3D-MSI data. We first acquired 14 3D-MSI datasets of human FFPE bladder cancer resections by enzymatic digestion with trypsin. This data was used to develop novel outlier detection methods that are based on quality controls incorporated in the sample preparation as well as the acquired data itself. Using cytochrome *c* on every slide as quality control to monitor digestion efficiency enables the identification of those slides on which digestion performed insufficiently. The other outlier method is based on the *z*-directed regression of the single masses thereby identifying those outliers based on other technical variations. Combined, these two methods resulted in 56 sections being marked as outliers out of the total 280 sections measured, giving a realistic reproducibility rate of 80%. Besides these, a method was developed to determine the minimum amount of sections needed to be molecularly representative of the whole tissue. This showed that for this type of sample 33% of the sections is sufficient to be representative of the whole tissue. This strategy can be transferred to other studies and aid in reducing the workload of 3D-MSI studies.

This expertise is applied in **chapter 4** where N-glycan changes are investigated during esophageal adeno-carcinogenesis. To this end, 24 human FFPE esophageal resections have been digested using PNGase F to obtain N-glycosylation profiles. Due to the heterogeneous behavior of disease progression, one patient per stage was first imaged in 3D and the number of representative sections was determined. This showed that 4 sections are required and subsequently used for the remaining patients and called 2.5D-MSI. Analysis of the 2.5D-MSI data marked 3 N-glycans as more abundant in adenocarcinoma whose presence could be explained by publically available gene expression data. This combination of data demonstrates that specific N-glycosylation plays an important role and both MSI and gene data should be combined to gain a deeper understanding of this process.

The work presented in this thesis all contributes to one major valorization aspect portrayed in **chapter 5**. The potential of implementing 3D-MSI in the clinic as part of 3D pathology is described and requires collaboration between researchers, pathologists, and companies.

Samenvatting

Massaspectrometrie imaging (MSI) is een gangbare techniek geworden om de moleculaire samenstelling van biomedische weefsels ruimtelijk vast te leggen. Verbeteringen in monster voorbereiding en instrumentatie bevorderde de ontwikkeling van 3D-MSI om een dieper inzicht te verkrijgen in de ruimtelijke en moleculaire complexiteit van biologische processen in weefsels. In dit proefschrift worden de uitdagingen bij het toepassen van 3D-MSI in biomedisch onderzoek beoordeeld en aangepakt. De nieuw ontwikkelde methoden en vergaarde inzichten zijn vervolgens toegepast in cohortonderzoeken met meerdere patiënten.

In **hoofdstuk 1** maken de lezers kennis met het veld van 3D-MSI en zijn huidige uitdagingen. Deze uitdagingen zijn gericht op twee grote gebieden; monster voorbereiding en data-analyse. Voor beide worden die aspecten behandeld die in consideratie genomen moeten worden wanneer een 3D-MSI experiment wordt uitgevoerd als mede de knelpunten die nog moeten worden opgelost. Eén van die aspecten is hoe een enkele cel voor 3D-SIMS of seriële secties voor 3D-DESI en 3D-MALDI geprepareerd moet worden om 3D reconstructie mogelijk te maken. De experimentele opzet en hoe reproduceerbaarheid gewaarborgd kan worden wordt ook bediscussieerd. Dit vloeit uit in detectie van uitbijters als één van de uitdaging die geadresseerd moet worden tijdens data-analyse. Daarnaast worden 3D beeldreconstructie en multimodaal 3D-imaging beoordeeld. Globaal biedt dit hoofdstuk overwegingen die helpen bij het opzetten van (multi-patiënt) 3D-MSI onderzoeken.

Hoofdstuk 2 focust zich op monster voorbereiding van FFPE monsters en de vraag of een mogelijk nieuwe manier om 3D-MSI van deze biomedische weefsels te versnellen de detectie van lipiden is. Een uitgebreide analyse van de detecteerbare lipidenklassen van vers ingevroren en formaline gefixeerde nierweefsels van muis en rat leverde aanmerkelijke verschillen op. Amine-bevattende lipiden zijn volledig afgenomen en is waarschijnlijk het gevolg van verweving van deze lipiden met zichzelf als mede met amine-bevattende eiwitten. Door deze afname is een toename in sulfaten en cholesterol geconstateerd. Deze klassen-specifieke lipide verandering door

formaline fixatie laat zien dat voorzichtigheid in acht moet worden genomen wanneer biologische verklaringen worden genomen gebaseerd op lipide data van FFPE weefsels.

In **hoofdstuk 3** worden enkele uitdagingen in de data-analyse van 3D-MSI data aangepakt door het opzetten van een procedure voor het aanpakken van multi-patiënt 3D-MSI data. Eerst hebben we 14 3D-MSI gegevensbestanden van menselijk FFPE blaaskanker resecties vergaard door enzymatische digestie met trypsine. De verkregen data werd gebruikt om nieuwe detectiemethoden voor uitbijters te ontwikkelen die gebaseerd zijn op kwaliteitscontroles geïntrigeerd in de monster voorbereiding als ook de verweven data zelf. Gebruik maken van cytochroom *c* op elk glaasje als kwaliteitscontrole voor digestie efficiëntie faciliteerde de identificatie van die glaasjes waar dit ontoereikend was. De andere uitbijter detectiemethode is gebaseerd op de regressie van individuele massa's in de z-directie waarbij uitbijters, ontstaan door technische variatie, worden aangemerkt. Gecombineerd wezen deze methoden 56 secties van de in totaal gemeten 280 secties aan als uitbijter wat resulteert in een reproduceerbaarheid van 80%. Daarnaast was er een methode ontwikkeld om het minimale aantal secties te bepalen dat nodig is om op een moleculair niveau representatief te zijn voor het gehele weefsel. Dit gaf aan dat voor onze monsters 33% van de secties voldoende is om representatief te zijn voor het gehele weefsel. Deze strategie kan worden overgebracht naar andere onderzoeken en zo bijdragen aan het verminderen van de werklust van 3D-MSI onderzoeken.

Hoofdstuk 4 ziet de toepassing van de eerder ontwikkelde data-analyse methoden in een biologisch onderzoek naar N-glycan verandering tijdens slokdarm adeno-carcinogenese. Hiervoor zijn 24 menselijke FFPE slokdarm resecties enzymatisch gedigesteerd met PNGase F om N-glycans te verkrijgen. Vanwege het heterogene karakter van de ziekteprogressie is één patiënt per stadium eerst gemeten in 3D en het aantal representatieve secties bepaald. Dit wees uit dat 4 secties nodig zijn en dit is vervolgens gebruikt voor de resterende patiënten en wordt 2.5D MSI genoemd. Analyse van de 2.5D-MSI data duidde 3 N-glycans aan die meer aanwezig waren in adenocarcinomen en waarvan de aanwezigheid verklaard kon worden door publiek toegankelijk genexpressie data. Deze combinatie van data toont aan dat specifieke N-glycosylering een belangrijke rol speelt en dat MSI en

genetische data gecombineerd moet worden om een dieper inzicht te vergaren in dit proces.

Het werk dat gepresenteerd is in dit proefschrift draagt allemaal bij aan één belangrijk valorisatie aspect weergegeven in **hoofdstuk 5**. De realiseerbaarheid om 3D-MSI in de kliniek te implementeren als onderdeel van 3D pathologie is beschreven en vereist de samenwerking van onderzoekers, pathologen, en bedrijven.